

Para: Profissionais do Sistema de Saúde

Assunto: COVID-19: Diagnóstico Laboratorial **(ATUALIZAÇÃO)**

Fonte: **Direção Regional da Saúde**

Contacto na DRS: sres-drs@azores.gov.pt

1. Diagnóstico Laboratorial

- a) O diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 deve ser aplicado em função dos critérios definidos nas Normas da Direção Regional da Saúde¹, nomeadamente, para confirmação de casos de COVID-19, critérios de alta e em circunstâncias particulares definidas pelo médico assistente ou pelas Autoridades de Saúde, avaliadas caso a caso.
- b) O diagnóstico laboratorial será realizado, preferencialmente, em laboratório hospitalar da Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico do SARS-CoV-2, na rede complementar de laboratórios privados ou no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) – laboratório de referência nacional (Apêndice 1);
- c) Os produtos biológicos são enviados ao laboratório o mais rapidamente possível, em ambiente refrigerado (Anexo I), logo após a sua colheita.
- d) A deteção laboratorial de referência do SARS-CoV-2 é feita por RT-PCR em tempo real (rRT-PCR)².

2. Colheita de Produtos Biológicos

- a) A colheita de produtos biológicos deve ser efetuada por profissionais devidamente habilitados para a realização da colheita, conservação e

¹<https://covid19.azores.gov.pt/>

² WHO (2020). Laboratory Testing for 2019 novel Coronavirus in suspected human cases. WHO. Disponível em: <https://www.who.int/healthtopics/coronavirus/laboratory-diagnostics-for-novel-coronavirus>

acondicionamento (Anexo II).

- b) Os profissionais de saúde que realizem colheitas de produtos biológicos devem cumprir as recomendações de utilização de Equipamento de Proteção Individual (EPI) contempladas na CN 29 A, de 13/04/2020 da DRS.
- c) Para o diagnóstico laboratorial de SARS-CoV-2 está indicada a colheita de produtos biológicos do trato respiratório (superior e/ou inferior, de acordo com o contexto clínico), podendo estes ser complementados, para fins de estudo e investigação, por colheita de sangue ou de outros produtos biológicos (Anexo I).

3. Devem ser colhidos produtos biológicos do:

3.1. Trato respiratório superior

- a) Exsudado da nasofaringe e exsudado da orofaringe colhido com zaragatoa em meio de transporte para vírus. Os dois produtos biológicos colhidos com zaragatoa devem ser colocados no mesmo tubo, contendo meio de transporte para vírus (2-3 ml) ou, em alternativa, em contexto de escassez de meio de transporte, na mesma quantidade de soro fisiológico. Deve dar-se prioridade à colheita do exsudado da nasofaringe (ou aspirado nasofaríngeo ou lavado nasal) quando não for possível a colheita dos dois exsudados.
- b) Em contexto de insuficiência de zaragatoas, a colheita do exsudado da orofaringe e da nasofaringe pode ser realizada com a mesma zaragatoa³.

3.2. Trato respiratório inferior

- a. Aspirado endotraqueal ou lavado bronco-alveolar, em doentes com

³ <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/covid-19-rapid-risk-assessment-coronavirus-disease-2019-eighth-update-8-april-2020.pdf>

doença respiratória grave, sob ventilação mecânica invasiva.

- b. Pode ser colhida expectoração se houver tosse produtiva.
- c. Se analisado apenas um tipo de produto biológico, com resultado laboratorial negativo para SARS-CoV-2, em doentes internados e se o agravamento da doença o justificar, é recomendada a colheita de um segundo produto biológico para o diagnóstico laboratorial.

Em **idade pediátrica** deve colher-se um exsudado da nasofaringe (sendo por vezes mais fácil, nestas idades, a colheita de aspirado ou lavado nasal) e uma colheita de exsudado da orofaringe.

4. Os produtos biológicos devem ser colhidos de acordo com as seguintes técnicas⁴:

- a) Exsudado da nasofaringe: Inserir a zaragatoa numa das narinas paralelamente ao palato até sentir uma ligeira resistência. Deixar a zaragatoa durante alguns segundos para absorção das secreções. Remover lentamente com movimento de rotação. Pode repetir a colheita na outra narina.
- b) Exsudado da orofaringe: Inserir a zaragatoa na cavidade oral e esfregar a parede faríngea e os pilares da orofaringe. Evitar friccionar o palato mole ou tocar com a zaragatoa na língua.
- c) Exsudado da orofaringe e da nasofarínge com a mesma zaragatoa: Iniciar a colheita pela orofaringe e passar, em seguida, à nasofaringe seguindo as instruções anteriores.

⁴ Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), CDC, 19 março, 2020.

5. **Os testes serológicos quantitativos poderão suportar a investigação dos casos de infeção pelo SARS-CoV-2**, revestindo-se da maior importância a avaliação e quantificação da presença de anticorpos para estudos de imunidade. Neste contexto são necessárias:
- a) Duas amostras de soro, uma primeira da fase aguda da doença e uma segunda do período de convalescença (2-4 semanas após o início dos sintomas), para a realização de testes serológicos.
6. **Em *post-mortem*, ponderar a colheita de exsudados do trato respiratório superior**. Se o tubo endotraqueal estiver colocado pode também ser colhido um aspirado.
- a) Caso a autópsia seja considerada, colher amostra de tecido da traqueia e/ou pulmonar (por incisão ou agulha) e, quando possível, das margens dos infiltrados intersticiais e/ou outro tecido ou produto biológico considerado relevante.
 - b) Caso se verifique a necessidade de proceder a colheita em *post-mortem* ou em situação de autópsia cumprir as recomendações descritas na CN n.º. 17, de 23/03/2020 da DRS ⁵.
7. **Para assegurar uma boa comunicação com o laboratório**, este deve ser informado da proveniência dos produtos biológicos. Os produtos biológicos devem ser corretamente identificados e acompanhados da notificação do SINAVE com a informação relativa ao doente.

⁵ Consultar Circular Normativa n.º17, de 23 de março de 2020 – Infeção por SARS-CoV-2 (COVID-19) – Cuidados post mortem, autópsia e casas mortuárias (https://covid19.azores.gov.pt/?page_id=19)

8. Condições de Segurança no Acondicionamento e Transporte de Produtos Biológicos

Os profissionais de saúde devem cumprir as regras de prevenção e controlo de infeção aplicáveis, bem como a correta e adequada utilização de EPI, de acordo com a CN da DRS n.º. 29A de 13/04/2020.

9. De modo a acondicionar e transportar corretamente os produtos biológicos, deve proceder-se da seguinte forma (Anexo II):

- a) Após a colheita dos produtos biológicos, os tubos e recipientes devem ser bem vedados;
- b) Os tubos e recipientes devem ser desinfetados exteriormente com solução de hipoclorito de sódio, na concentração original de cloro livre a 5%, na diluição de 1/50 (1 parte de lixívia em 49 partes iguais de água) e de seguida, com álcool a 70%⁶;
- c) Por fim, a tampa do tubo deve ser selada com película parafilme;
- d) Acondicionar os tubos e recipientes contendo os produtos biológicos, seguindo as normas de embalagem de substâncias infecciosas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde⁷ para amostras classificadas de categoria B (UN 3373);
- e) Utilizar o sistema de embalagem tripla com as seguintes características:
 - i. **Contentor primário** é o que contém o produto biológico; deve estar devidamente identificado e tem de ser estanque a líquidos e a sólidos; tem de ser embalado em material absorvente suficiente para

⁶ Consultar Circular Normativa n.º20/2020, de 23 de março de 2020 – Infeção por SARS-CoV-2 (COVID-19) – Limpeza e desinfecção de superfícies em estabelecimentos de atendimento ao público ou similares - Infeção por SARS-CoV-2 (COVID-19) (https://covid19.azores.gov.pt/?page_id=19)

⁷ WHO (2020). Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019–2020. WHO. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325884/WHO-WHE-CPI-2019.20-eng.pdf>
IATA (2011). PACKING INSTRUCTION 650. IATA. Disponível em <https://www.iata.org/contentassets/b08040a138dc4442a4f066e6fb99fe2a/dgr-61-en-pi650.pdf>

- absorver todo o conteúdo em caso de quebra ou derrame;
- ii. **Contentor secundário** é o que leva os contentores primários (tubos com os produtos biológicos) e deve ser resistente, à prova de água e estanque a líquidos e a sólidos; pode conter vários tubos, de colheitas diferentes, desde que estes sejam protegidos com material absorvente e amortecedor, individualmente e separados, a fim de evitar o contacto;
 - iii. **Contentor exterior** é a embalagem de transporte externa com material de acolchoamento adequado, onde se coloca o contentor secundário. A menor dimensão externa global utilizada deve ser de 10 x 10 cm.
- f) O transporte dos produtos biológicos deve ser realizado, preferencialmente, por uma empresa certificada e autorizada para o efeito (Categoria B, UN 3373) ou em alternativa, em transporte próprio da unidade de saúde, cumprindo as indicações de acondicionamento anteriormente referidas;
- g) O transporte é da responsabilidade da unidade de saúde que realiza a colheita dos produtos biológicos, sendo obrigatório a indicação do remetente e do destinatário em documento afixado no exterior da embalagem.

10. Testes Laboratoriais de Referência

- a) O tratamento dos produtos biológicos e a inativação do RNA viral deve ser realizado em laboratório de biossegurança de nível 2 (BSL2) e utilizando uma câmara de fluxo laminar de classe II.
- b) O diagnóstico laboratorial de referência do SARS-CoV-2 é realizado através de testes de amplificação de ácidos nucleicos, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real, precedida de transcrição

reversa (RT-PCR)⁸.

- c) Os testes de rRT-PCR para a deteção do SARS-CoV-2 disponíveis podem incluir como alvo os genes que codificam para a nucleoproteína (N), o invólucro (E), a espícula (S), a RNA dependente RNA polimerase (RdRp).
- d) Um caso de COVID-19 considera-se confirmado laboratorialmente perante um teste que apresente:
 - i. Resultado de rRT-PCR para SARS-CoV-2 positivo para pelo menos dois alvos distintos do genoma, dos quais pelo menos um específico para SARS-CoV-2 (que distinga dos outros coronavírus, incluindo o SARS-CoV-1).
- e) Se surgir um caso com um resultado de inconclusivo ou com um valor de ciclo de amplificação do rRT-PCR superior a 35, recomenda-se a repetição do teste e/ou da colheita do produto biológico.
- f) Os produtos biológicos que apresentem um resultado analítico duvidoso ou que necessitem de análise complementar devem ser enviadas ao Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios do Departamento de Doenças Infeciosas, do INSA.
 - a. Para além dos controlos internos, para assegurar a qualidade do produto biológico (e do processo de diagnóstico molecular), sugere-se, sempre que possível, a co-amplificação e deteção de DNA humano no produto biológico. A co-deteção de DNA humano no produto biológico pressupõe que o RNA viral poderá ser detetado, se presente no momento da colheita.
 - b. Os laboratórios da Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico

⁸ World Health Organization (WHO). Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: Interim guidance - 19 March 2020. Geneva: WHO; 2020 [11 March 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>

do novo coronavírus devem enviar ao INSA uma seleção de amostras positivas para SARS-CoV-2 que representem diferentes momentos da epidemia, grupos etários e áreas geográficas, em número a combinar com o laboratório; e as 5 primeiras amostras negativas para estudo/investigação e avaliação da comparabilidade de resultados.

11. Sequenciação do Genoma Viral^{9,10}

- a) A metodologia de sequenciação de nova geração (NGS) está disponível no INSA, para a realização do estudo do genoma do SARS-CoV-2.
- b) Para além da confirmação de casos de infeção pelo SARS-CoV-2, a integração da análise genómica do novo coronavírus com a informação epidemiológica e clínica dos casos de COVID-19 é crítica para o estudo/investigação e controlo da transmissão do vírus na comunidade, monitorização da doença e de marcadores genómicos associados à gravidade da doença.
- c) O conhecimento do genoma viral permite ainda avaliar o desempenho dos testes de diagnóstico laboratorial.
- d) É fortemente recomendada a partilha das sequências virais em bases de dados, como o GISAID, que garantem os direitos de autor e de submissão.
- e) Devem ser enviadas ao Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios do Departamento de Doenças Infeciosas do INSA, para sequenciação do genoma viral, uma seleção de amostras positivas de casos de COVID-19 (em número a ser combinado com os laboratórios) que representem diferentes momentos da epidemia,

⁹ ECDC. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update, ECDC, 12 março, 2020. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixthupdate-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf>

¹⁰ Plano Nacional de Preparação e Resposta à Doença por novo coronavírus (COVID-19), DGS, 2020. Disponível em: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/plano-nacional-de-preparacao-e-resposta-para-a-doenca-por-novocoronavirus-covid-19-pdf.aspx>

grupos etários e áreas geográficas.

O Diretor Regional

Apêndice 1 - Laboratórios com capacidade para diagnóstico laboratorial
(sujeito a atualização)

Laboratórios
Laboratório Nacional de Referência
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I. P. - Lisboa
ARS Norte
Centro Hospitalar Universitário de S. João, E.P.E. - Porto
Centro Hospitalar Universitário do Porto, E.P.E. - Porto
Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, E.P.E. - Gaia
Hospital da Senhora da Oliveira Guimarães E.P.E. - Guimarães
Unidade Local de Saúde de Matosinhos, E.P.E. - Hospital Pedro Hispano - Matosinhos
Hospital de Braga, E.P.E. - Braga
ARS Centro
Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, E.P.E. - Coimbra
Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E. - Covilhã
Unidade Local de Saúde da Guarda, E.P.E., - Guarda
ARS Lisboa e Vale do Tejo
Centro Hospitalar e Universitário de Lisboa Central, E.P.E. - Lisboa
Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Norte, E.P.E. - Lisboa
Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, E.P.E. - Lisboa
ARS Alentejo
Hospital Espírito Santo de Évora, E.P.E. - Évora
ARS Algarve
Laboratório Regional de Saúde Pública Dra. Laura Aires - Faro
Região Autónoma dos Açores
Hospital de Santo Espírito da Ilha Terceira, E.P.E.R. - Ilha Terceira
Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada, E.P.E. - Ilha de S. Miguel
Região Autónoma da Madeira
Serviço de Saúde da RAM, E.P.E. – Hospital Dr. Nélio Mendonça - Ilha da Madeira

Anexo I
Acondicionamento de produtos biológicos

Tipo de produto biológico	Dispositivo de colheita	Transporte	Acondicionamento	Observações
Exsudado da nasofaringe e orofaringe	Zaragatoa de dracon ou floculada	2-8°C	≤5 dias: 2-8°C ≥5 dias: -70°C	Zaragatoas da naso e orofaringe devem ser colocadas no mesmo tubo com meio de transporte viral**
Expetoração	Contentor estéril	2-8°C	≤48 horas: 2-8°C ≥48 horas: -70°C	
Lavado bronco-alveolar	Contentor estéril	2-8°C	≤48 horas: 2-8°C ≥48 horas: -70°C	Amostra de importante valor para o diagnóstico laboratorial
Aspirado endotraqueal, nasofaríngeo, ou lavado nasal	Contentor estéril	2-8°C	≤48 horas: 2-8°C ≥48 horas: -70°C	
Sangue (soro)*	Tubo seco (3-5 ml)	2-8°C	≤5 dias: 2-8°C ≥5 dias: -70°C	Pares de soros: agudo-1 ^a semana de doença; convalescença-2-3 semanas depois
Tecidos de biópsia*	Contentor estéril com soro fisiológico ou meio de transporte para vírus	2-8°C	≤5 dias: 2-8°C ≥5 dias: -70°C	
Fezes*	Contentor estéril	2-8°C	≤5 dias: 2-8°C ≥5 dias: -70°C	
Urina*	Contentor estéril	2-8°C	≤5 dias: 2-8°C ≥5 dias: -70°C	

*Em casos pontuais poderá ser acordado a colheita de produtos biológicos complementares

**Em alternativa, em contexto de escassez de meio de transporte para vírus, pode ser utilizado soro fisiológico na mesma quantidade

Anexo II

Diagnóstico laboratorial de infeção por SARS-CoV-2

Procedimento para a realização de colheita de produtos biológicos e encaminhamento ao laboratório

I. Produtos biológicos respiratórios: Devem ser enviados 2 produtos biológicos respiratórios de diferente natureza para o diagnóstico de infeção por SARS-CoV-2. Juntar formulário de notificação SINAVE.

Produtos biológicos respiratórios:

- Exsudado da nasofaringe colhido com zaragatoa;
- Exsudado da orofaringe colhido com zaragatoa;
- Expetoração;
- Aspirado endotraqueal ou lavado bronco-alveolar.

Quando não for possível a colheita dos dois exsudados, deve dar-se prioridade à colheita do exsudado da nasofaringe

Em contexto de insuficiência de zaragatoas, a colheita do exsudado da orofaringe e da nasofaringe pode ser realizada com a mesma zaragatoa

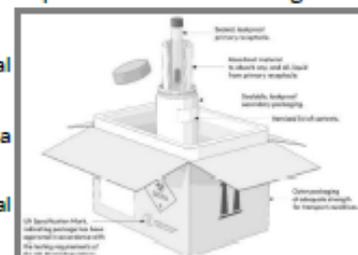
II. Instruções de colheita dos exsudados:

- Exsudado da nasofaringe: Inserir a zaragatoa numa das narinas paralelamente ao palato até sentir uma ligeira resistência. Deixar a zaragatoa durante alguns segundos para absorção das secreções. Remover lentamente com movimento de rotação. Repetir a colheita na outra narina.
- Exsudado da orofaringe: Inserir a zaragatoa na cavidade oral e esfregar a parede faríngea e os pilares da orofaringe. Evitar friccionar o palato mole ou tocar com a zaragatoa na língua.
- Exsudado da orofaringe e da nasofaringe com a mesma zaragatoa: Iniciar a colheita pela orofaringe e passar, em seguida, à nasofaringe, seguindo a instruções anteriores.

III. Acondicionamento de produtos biológicos:

Desinfetar exteriormente os tubos e recipientes no local da colheita. Selar com parafilme as tampas dos tubos. Utilizar sistema de embalagem tripla (categoria B, UN 3373). Transporte em ambiente refrigerado.

- Contendor primário (contém a amostra, envolver em material absorvente e colocar em saco plástico);
- Contendor secundário (resistente, à prova de água, estanque a líquidos e sólidos);
- Contendor exterior (embalagem de transporte externa, material acolchoado, dimensão mínima 10x10 cm).



IV. Transporte:

Preferencialmente por empresa autorizada para o transporte de substâncias de categoria B (UN 3373), ou em transporte próprio da unidade de saúde.